添加剂对大孔吸附树脂固定化脂肪酶的影响

林海蛟[1,2]，张继福[3]，张云[1]，孙爱君[1]，胡云峰[1*]

1 中国科学院南海海洋研究所，中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室，广州 510301

2 中国科学院大学，北京，100049

3 广东省中医院，广州 510120

摘要：利用大孔吸附树脂 DA-201 为载体对海洋脂肪酶固定化，并探寻添加剂对固定化过程的影响。分别以 NH_4Cl、甘露糖和甘氨酸为添加剂，采用单因素和正交实验相结合的方法优化条件。结果显示，以 NH_4Cl 为添加剂的最优条件：柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 pH 6.0，固定化温度 30℃，载体投放量 0.5g，NH_4Cl 浓度为 25mmol/L，固定化时间 3.0h，酶活力达到 115.27U/g；比不含有添加剂的固定化酶固定化效率提高 47.42%。以甘露糖为添加剂最有条件：磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液 pH7.0，固定化温度 35℃，载体投放量 0.5g，甘露糖浓度 10mmol/L，固定化时间 4.5h；酶活力达到 122.75U/g，比不含有添加剂的固定化酶固定化效率提高 6.50%。以甘氨酸为添加剂的最优条件：磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液 pH7.0，固定化温度 20℃，载体投放量 0.5g，甘氨酸浓度为 25mmol/L，固定化时间 7.5h；酶活力达到 141.69U/g，比不含有添加剂的固定化酶固定化效率提高 26.12%。采用不同添加剂对大孔吸附树脂 DA-201 的吸附固定化过程有较大影响，可以极大的提高吸附效率；同时发现缓冲液类型、pH、温度、添加剂浓度和固定化时间等对 DA-201 树脂吸附脂肪酶有很大影响，对后续吸附固定化工业酶研究有较好的参考价值。

关键词：大孔吸附树脂；海洋脂肪酶；固定化；添加剂

中图分类号：Q814.2

The Effective of Additives on the Immobilization of Lipase by Microporous Absorbent Resin

LIN Hai-jiao[1,2], ZHANG Ji-fu[3], ZHANG Yun[1], SUN Ai-jun[1], HU Yun-feng[1]*

1. CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510301

2. University of Chinese Academy of Sciences，Beijing 100049，China

3. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou, 510120

Abstract: Macroporous absorbent resin DA-201 was adopted as a carrier to immobilize marine-derived lipase, and the influence of additives on the immobilization process was explored. NH_4Cl, mannose and glycine were used as the additives, and the conditions were optimized by a combination of single factor and orthogonal experiments. The results showed that the optimal conditions with additive NH_4Cl were: citric acid-sodium citrate buffer pH6.0, immobilization temperature 30°C, carrier quantity 0.5g, NH_4Cl concentration 25mmol/L, immobilized time 3.0h; enzyme activity reached 115.27U/g, which was 47.42% higher than that of the immobilized enzyme without additive. The optimal conditions with additive mannose were: potassium dihydrogen phosphate-sodium hydroxide buffer pH7.0, immobilized temperature 35°C, carrier quantity 0.5g, mannose concentration 10mmol/L, the immobilized time 4.5h; the enzyme activity reached 122.75U/g, which was 6.50% higher than that of the immobilized enzyme without

作者简介：林海蛟（1992-），男，汉族，广东雷州，硕士生，主要从事固定化酶制剂研究，linhaijiaoruffy@163.com；*通讯作者：胡云峰(1980-)，男，汉族，山东日照，研究员，博士，博士生导师，yunfeng.hu@scsio.ac.cn

基金项目：非常感谢广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目（A201701C12），中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404)，中国科学院“科学”号高端用户项目（KEXUE2018G05），广东省自然科学基金项目（2018A030313151）和“科学”号科考船对本工作的支持。

additive. The optimal conditions with glycine additive: potassium dihydrogen phosphate-sodium hydroxide buffer pH7.0, immobilized temperature 20°C, carrier quantity 0.5g, the glycine concentration 25mmol/L, the immobilized time 7.5h; the enzyme activity reached 141.69U/g, which was 26.12% higher than that of the immobilized enzyme without additive. The addition of different additives exhibited great effects on the immobilization through absorbtion by macroporous absorbent resin DA-201 and could greatly improve the adsorption efficiency. Additionally, buffer type, pH, temperature, additive concentration and immobilization time were found to have great influence on the adsorption of lipase by resin DA-201, which provides good reference for subsequent research of the immobilization of industrial enzymes.

Keywords：Macroporous absorbent resin; Marine lipase; Immobilization; Additives

引言：

脂肪酶(lipase，EC 3.1.1.3)隶属于羧基酯水解酶类，能够逐步的将甘油三酯水解成甘油和脂肪酸，催化水解、醇解酯化和转酯等化学反应[1~3]。在食品、农业和医药等领域具有巨大的应用价值[4~7]。然而，在实际使用中游离脂肪酶对环境高度敏感，不稳定且可变性大[8]。而且酶催化剂的价格通常很高，并且难以在反应体系中分离回收利用昂贵的游离酶，这些问题导致生产成本增加，成为酶工业化的技术瓶颈，并限制了游离脂肪酶的广泛应用。为了解决这个问题，酶的固定化技术被提出。脂肪酶在固定化后仍然具有较高的酶活力和回收率，而且固定化后脂肪酶的稳定性和耐受性等重要工业性能都有相应的提高[9]，因此，相对游离脂肪酶，固定化脂肪酶更具有经济价值，其应用更加广泛。常见的固定化技术有吸附法、交联法、包埋法及共价交联法四种。四种方法各具优缺点，其中吸附固定法具有不改变酶构象、载体选择范围广、价格低和操作简单等优点[10]。因此本实验使用吸附法进行固定化脂肪酶。

大孔吸附树脂是一种不含交换基团、具有大孔结构的有机高聚物吸附剂，平均孔径为10-13nm，利用本身的范德华力或氢键进行吸附[11]；又由于具有大孔网状结构和比较大的比表面积而有筛选性能[12]，而且大孔吸附树脂具有不溶于酸、碱、有机溶剂和稳定性好等特点[13]。近年来，大孔吸附树脂在酶固定化领域运用越来越广泛，如谢雪凤等[14]利用大孔吸附树脂 AB-8 固定化过氧化氢酶；赵庆节等[15]以大孔吸附树脂 HZ-841 为载体固定化脂肪酶，并以制得的固定化酶催化拆分消旋萘普生；王海雄[16]以大孔吸附树脂为载体吸附固定化猪胰脂酶。因此，本研究选择大孔吸附树脂作为吸附固定化的载体，通过良好的吸附性能进行工业酶的固定化制剂研究，可以有效的避免化学固定化法对工业酶功能的损害。

同时，根据相关研究表明，一些添加试剂也会对游离酶和固定化酶产生促进或者钝化的影响。比如利用异丙醇处理固定化脂肪酶，其对（*S*）-酮洛芬羟烷基酯在有机溶剂中合成的对映选择性和反应速率明显增强[17]。彭维等[18]研究了不同金属离子对β-葡聚糖酶及木聚糖酶酶活力的影响，发现 Na^+、K^+、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{3+}、Ca^{2+}对β-葡聚糖酶具有激活作用，而Cu^{2+}对其起抑制作用；Na^+、K^+、Ca^{2+}对木聚糖有激活作用，Mg^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{3+}、Ca^{2+}则起抑制作用。但是关于无机盐、糖类和氨基酸等其他添加剂对固定化过程以及使用大孔树脂固定化酶的影响的研究极少，因此本研究针对海洋脂肪酶固定化过程，先筛选出固定化效果较好的大孔吸附树脂 DA-201 和添加剂类种，系统探究这三种添加剂对大孔吸附树脂 DA-201 固定化脂肪酶的影响，并进一步研究固定化海洋来源脂肪酶的最优温度、pH、载体量、时间等对吸附固定化有重要影响的因素，以确定最优工艺条件。

1.材料与方法

1.1 材料与仪器

材料：海洋（假丝酵母）脂肪酶（上海鼓臣生物有限公司）、大孔吸附树脂（郑州和成

新材料科技有限公司）、聚乙烯醇 PVA（天津市大茂化学试剂厂）、无水醋酸铜（阿拉丁）、橄榄油（上海麦克林生化科技有限公司）、无水乙醇（天津市津东天正精细化学试剂厂）、异辛烷（天津富宇精细化工有限公司）、糖类、氨基酸、无机盐（广州东巨有限公司）。

仪器：PB-10 酸度计（德国 Sartorus 公司）、Allegra X-30R Centrifuge 型离心机（Beckman, Coulter）、DJS-2012R 型恒温摇床（上海实维实验仪器技术有限公司）、SCIENTZ-IID 型超声破碎仪（宁波新芝生物公司）、酶标仪(瑞士 Tecan Infinite M200 Pro 公司)、涡旋振荡器（Tomos）、DK-8D 水浴锅（上海一恒科学仪器有限公司）、电热鼓风箱（上海一恒科学仪器有限公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 酶活力的测定

使用改进铜皂分光光度法[19]测酶活力。在 25mL 的试管中依次加入 1mL 橄榄油底物乳化液和 1.25mL0.05mol/L 的磷酸钠缓冲液，40℃预热 5min，再加入脂肪酶液上清，40℃摇床恒温震荡 15min。然后取出，快速加入 0.5mL 6 mol/L 盐酸和 3mL 95%的乙醇终止酶活性。混匀之后，加入 1.5mL 的异辛烷溶液，在涡旋振荡器上震荡 2min，使其充分混匀，然后放在 60℃水浴锅静置分层，再常温水冷却 5min 后，吸取上层异辛烷 0.5mL 于新的试管中，再加入 2mL 异辛烷和 0.5mL 的铜盐显色剂，在涡旋振荡器上继续震荡 2min。静置 1min 以上，取上层液 0.1mL 在酶标仪中测其 OD 值。

$$X=\frac{cV}{tV'}$$

式中：X 为脂肪酶活力，U/mL

c 为脂肪酶浓度，μmol/mL

V 为脂肪酸溶液体积，mL

V’为酶液用量，mL

t 为酶解反应时间，min

1.2.2 酶活力定义：在测定条件下（40℃，pH7.0），每分钟催化 1μmol 底物转化为脂肪酸所需的酶量为一个活力单位（U）[20]。

1.2.3 橄榄油底物乳化液配制[21]

称取聚乙烯醇（PVA，聚合度 1750）8.0g，加去离子水 200mL，在沸水浴中加热，搅拌，至全部溶解。冷却后，取 4%的 PVA 溶液 30mL，加橄榄油 10mL，用细胞破碎仪进行超声混匀，化成白色乳状液，4℃冰箱储存备用。

1.2.4 脂肪酶的固定化

称取一定量的载体放在塑料管内，然后加入 10mL 脂肪酶上清液，在 200rpm/min 摇床摇匀。

1.3 大孔吸附树脂的筛选

大孔吸附树脂载体有：D4020、DA-201、HPD100、NKA-9、NKA-Ⅱ、H103、HPD700、X-5、GDX-104。在 pH6.5、温度 30℃、固定化时间 3h、1.0g 载体的条件下进行固定化。选出酶活力最高的大孔吸附树脂。

1.4 添加剂对脂肪酶固定化的影响

用 0.05 mol/L PBS 缓冲液溶解酶粉，配成浓度为 2.0mg/mL 的脂肪酶液，再取 10.0mL 上清酶液加入盛有 1.0g 大孔吸附树脂 DA-201 的 50mL 塑料管中。同时加入 2、5、10mmol/L 三个浓度梯度的添加剂。糖类添加剂有木糖醇、甘露糖、海藻糖、D-木糖、山梨醇、蔗糖、半乳糖、麦芽糖、葡萄糖和果糖 10 种；无机盐添加剂有 KCl、NH_4Cl、$MgCl_2$、$CaCl_2$、Na_2CO_3、NaCl、$(NH_4)_2SO_4$、Na_2SO_4 和 $MgSO_4$ 共 9 种；氨基酸添加剂有丙氨酸、苏氨酸、甘氨酸、

丝氨酸、和缬氨酸共5种。在相应的空白组中不添加任何添加剂。放于30℃恒温摇床，200r/min条件下固定3h。用0.05mol/L PBS缓冲液洗去表面酶分子，抽滤、烘干测酶活力。

1.5 脂肪酶固定化单因素实验

1.5.1 缓冲液类型的选择

分别配制pH6.5的磷酸钠缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液、磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液，再用这四种缓冲液溶解脂肪酶粉剂，配成浓度2.0mg/mL的酶液，分别取10.0mL放在50mL的塑料管，加入1.0g大孔吸附树脂DA-201，在30℃、200r/min的摇床中吸附固定化3h。

1.5.2 缓冲液pH对吸附固定化的影响

采用1.5.1选出的缓冲液类型，配制出系列pH梯度。柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配成pH3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5梯度；磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液配成pH6.0、6.5、7.0、7.5、8.0梯度。并将脂肪酶溶解于上述缓冲液中，配成浓度2.0mg/mL的酶液。以NH_4Cl为添加剂时使用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。以甘露糖或甘氨酸为添加剂时使用磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液。放于30℃、200r/min的摇床中吸附固定化3h。

1.5.3 温度对吸附固定化的影响

准确称取1.0g大孔吸附树脂DA-201，放入50mL的塑料管中。根据添加剂类型选择对应缓冲液溶解脂肪酶粉，取10mL脂肪酶上清液加入塑料管中，分别放在20、30、40、50、60℃的摇床中，200r/min固定化3h。

1.5.4 载体量对吸附固定化的影响

分别称取0.5、1.0、1.5、2.0、2.5g的大孔吸附树脂DA-201，放入50mL塑料管中。根据添加剂类型选择对应缓冲液溶解脂肪酶粉，加入10.0mL酶上清液。根据1.5.3选择不同添加剂的固定化温度，在200r/min的摇床固定化3h。

1.5.5 添加剂浓度对吸附固定化影响

分别将无机盐、糖类、氨基酸三类添加剂配成500mmol/L的母液，然后在10mL的酶上清液中稀释成2、5、10、20、30mmol/L的浓度梯度，加到50mL的塑料管中。根据添加剂类型选择对应缓冲液、温度、载体量，在200r/min摇床固定化3h。

1.5.6 固定化时间对吸附固定化的影响

其他条件同1.5.5，糖类添加剂浓度为2mmol/L，固定化时间为1.5、3.0、6.0、9.0、12.0h；无机盐浓度为20mmol/L，固定化时间为1.5、3.0、6.0、9.0、12.0h；氨基酸添加剂浓度为20mmol/L，固定化时间为1.5、3.0、6.0、9.0、12.0h。

1.6 脂肪酶固定化正交实验方法

在单因素实验基础上选择对固定化影响较大的因素设计4水平5因素的正交实验，以酶活力回收率为指标，正交实验因素与水平见表1。

表1：NH_4Cl固定化条件优化正交试验因素与水平

Table 1. Orthogonal test factors and levels of the optimization of immobilization in the presence of NH_4Cl

序号	pH	温度/℃	载体量/g	浓度/mmol/L	时间/h
1	5.0	20	0.5	10	1.5
2	5.5	25	1.0	15	3.0
3	6.0	30	1.5	20	4.5
4	6.5	35	2.0	25	6.0

表2：甘露糖固定化条件优化正交试验因素与水平

Table 2. Orthogonal test factors and levels of the optimization of immobilization in the presence of

ammonium mannose

序号	pH	温度/℃	载体量/g	浓度/mmol/L	时间/h
1	6.0	25	0.5	2	1.5
2	6.5	30	1.0	5	3.0
3	7.0	35	1.5	10	4.5
4	7.5	40	2.0	15	6.0

表 2：甘氨酸固定化条件优化正交试验因素与水平

Table 2. Orthogonal test factors and evels of the optimization of immobilization in the presence of ammonium glycine

序号	pH	温度/℃	载体量/g	浓度/mmol/L	时间/h
1	6.0	20	0.5	10	3.0
2	6.5	25	1.0	15	4.5
3	7.0	30	1.5	20	6.0
4	7.5	35	2.0	25	7.5

2.结果与分析

2.1 大孔吸附树脂的筛选

检测筛选了 D4020、DA-201、HPD100、NKA-9、NKA-Ⅱ、H103、HPD700、X-5 和 GDX-104 共 9 种载体的吸附固定化效果；结果如图 1(a)所示，不同的吸附树脂对脂肪酶的吸附效果差异极大。大孔吸附树脂 DA-201 是苯乙烯型极性树脂，其物理化学性质稳定，对有机物的吸附选择性好[11]，筛选的结果表明 DA-201 的吸附效果较其他吸附载体好。

2.2 添加剂对脂肪酶固定化的影响

探究不同添加剂对脂肪酶吸附固定化的影响。无机盐添加剂试验了 KCl、NH_4Cl、$MgCl_2$、$CaCl_2$、Na_2CO_3、$NaCl$、$(NH_4)_2SO_4$、Na_2SO_4 和 $MgSO_4$ 共 9 种，每个无机盐设置 2、5、10mmol/L 三个浓度。结果如图 1(b)所示，NH_4Cl 和 $(NH_4)_2SO_4$ 添加剂能够对脂肪酶吸附固定化有促进作用，Na_2SO_4 和 $MgSO_4$ 对脂肪酶吸附固定化有钝化作用，KCl、$MgCl_2$、$CaCl_2$、Na_2CO_3 和 $NaCl$ 对脂肪酶吸附固定化影响不大。其中 NH_4Cl 的促进作用最为明显，可能是因为 NH_4Cl 的 NH_4^+ 和 Cl^- 可以改变大孔吸附树脂表面的电荷状态，或者可以改变脂肪酶的离子状态。因此选择 NH_4Cl 作为无机盐添加剂进行后续优化实验。

糖类添加剂有木糖醇、甘露糖、海藻糖、D-木糖、山梨醇、蔗糖、半乳糖、麦芽糖、葡萄糖和果糖 10 种，每个糖类设置 2、5、10mmol/L 三个浓度。结果如图 1(c)所示，每种糖类对固定化酶都有一定促进作用，其中甘露糖的促进作用最为明显，因此选择甘露糖作为糖类添加剂进行后续优化实验。

氨基酸选择丙氨酸、苏氨酸、甘氨酸、丝氨酸、和缬氨酸共 5 种，同样是每种氨基酸设置 2、5、10mmol/L 三个浓度。结果如图 1(d)所示，丙氨酸、苏氨酸、甘氨酸和丝氨酸对脂肪酶吸附固定化有促进作用，而缬氨酸对吸附效果不明显。其中甘氨酸促进效果最好，因此选择甘氨酸作为氨基酸添加剂进行后续优化实验。

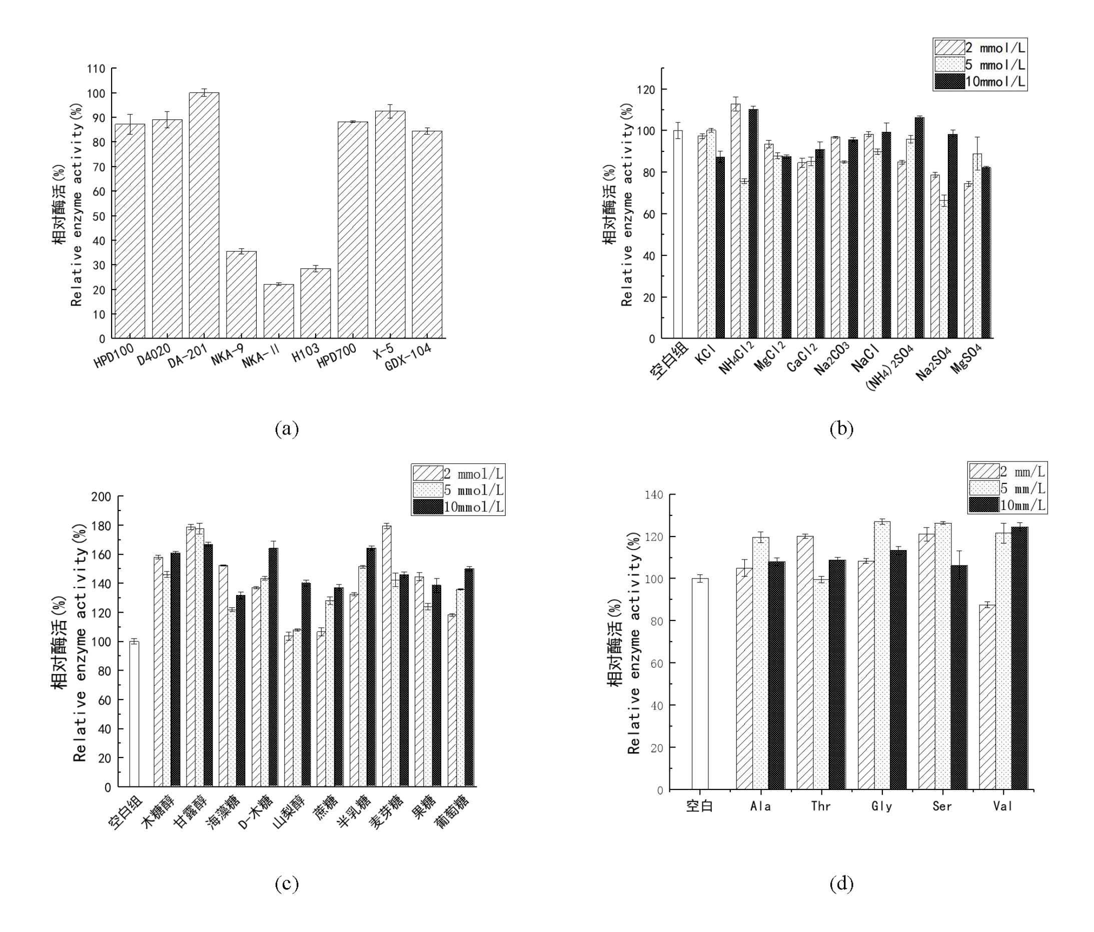


图 1 载体的筛选和添加剂对脂肪酶吸附固定化的影响

Fig.1 Screening of carriers and effects of additives on the adsorption immobilization of lipase (a)Screening of macroporous adsorption resin. (b) Effect of inorganic salt additives on the immobilization of lipase. (c) Effect of carbohydrate additives on the immobilization of lipase. (d) Effect of amino acid additives on the immobilization of lipase.

2.3 NH_4Cl 添加剂固定化条件对脂肪酶吸附固定化的影响

2.3.1 缓冲液类型及 pH 对脂肪酶固定化的影响

不同类型的缓冲液，所含有的离子不一样，其缓冲能力不一样。在 pH 为 6.5 的条件下，本实验使用了 4 种类型的缓冲液，分别为磷酸钠缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液、磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液。结果如图 2(a)所示，柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液固定化效果最好。因此选择柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液作为后续优化缓冲液。

使用选出的柠檬酸-柠檬酸钠进行 pH 对脂肪酶吸附固定化的影响，设置了 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 的 pH 梯度。由图 2(b)可知，缓冲液在 pH6.0 时酶活力达到最高，之后呈下降趋势，因此最佳固定化 pH 为 6.0。当偏酸时，pH 对酶活力影响较大，而在碱性环境中酶活力变化不大。

2.3.2 温度对吸附固定化的影响

由图 2(c)可知，随着固定化温度升高，固定化脂肪酶的活力总体呈现下降。原因可能是温度过高致使蛋白质天然结构发生改变，改变酶活性中心构象，从而导致酶活性减弱。因此最适固定化温度为 20℃。

2.3.3 载体量对吸附固定化的影响

在等体积等浓度的酶液中加入不同质量的载体，会对酶的吸附固定化有重要影响。在 10.0mL 浓度为 2.0mg/mL 的脂肪酶上清液中加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5g 的大孔吸附树脂

DA-201 载体，其他条件同 2.3.2。结果如图 2(d)所示，随着载体投放量逐渐增加，酶活力逐渐下降。原因可能是在载体投放量较少时，单位载体所吸附的酶分子较多，当载体量逐渐增多时，单位载体所吸附的酶分子逐步变少，所以酶活力下降。

2.3.4 NH_4Cl 浓度对吸附固定化的影响

将 NH_4Cl 配成 500mmol/L 的母液，然后在 10mL 的酶上清液中稀释成 2、5、10、20、30mmol/L 的浓度梯度，其他条件同 2.3.3。结果如图 2(e)所示，因此 20mmol/L 为脂肪酶吸附固定化的最佳 NH_4Cl 浓度。

2.3.5 固定化时间对吸附固定化的影响

设置了 1.5、3.0、6.0、9.0、12.0h 的时间梯度，结果如图 2(f)所示，随着固定化时间的增长，酶活力逐渐增高，在 6.0h 达到最高，之后呈下降趋势。原因可能是随着固定化时间的延长，DA-201 载体的孔隙吸附的酶分子逐渐增多，酶活力也随之增高；而当 DA-201 载体过长时间浸泡在酶溶液中，孔隙吸附的酶分子饱和导致阻塞，酶促反应时酶分子不能充分展开，酶活力随之降低。

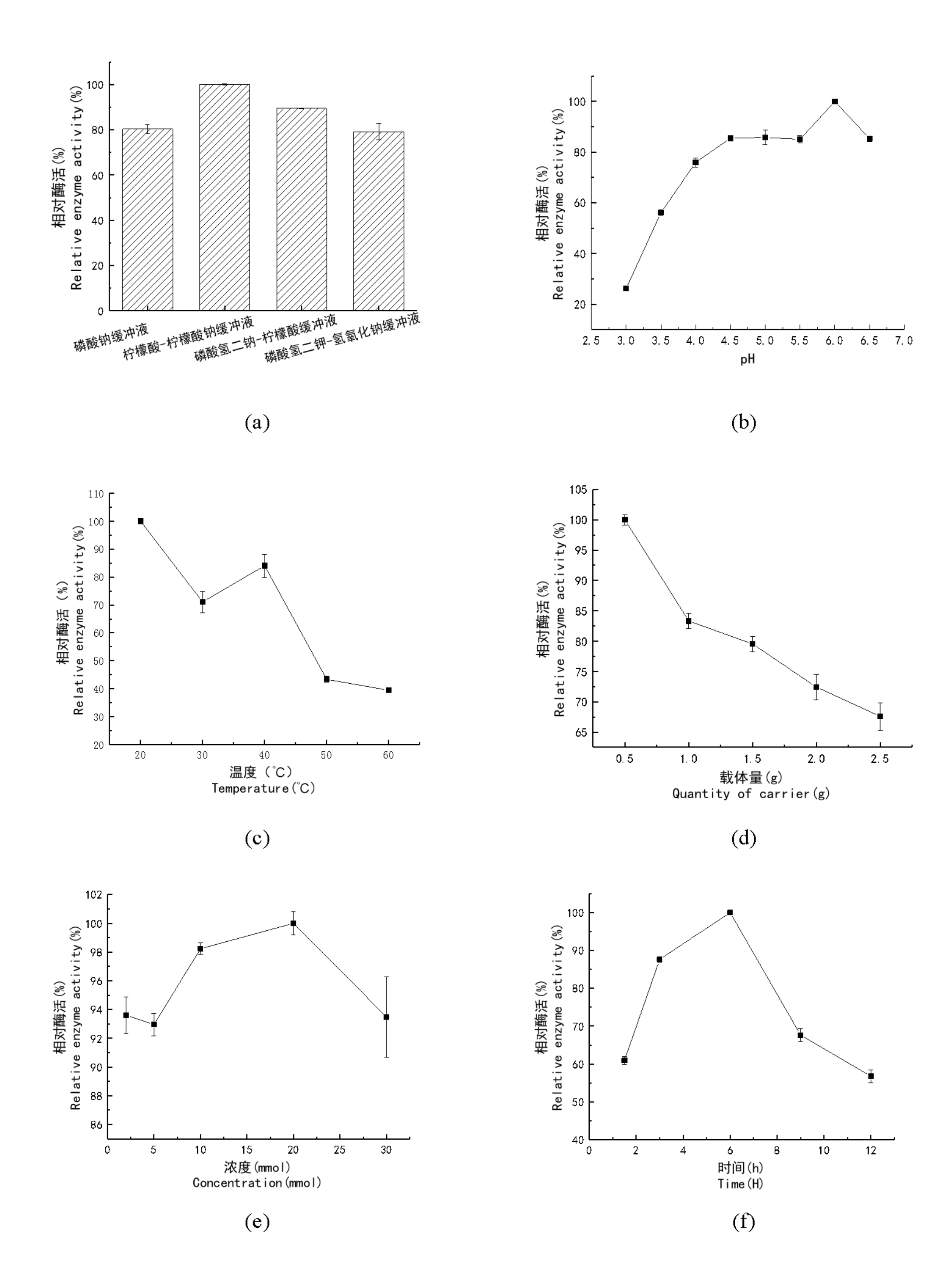


图 2. NH_4Cl 添加剂各条件对脂肪酶吸附固定化的影响

Fig.2 Optimization of lipase immobilization in the presence of NH_4Cl

(a) Effect of buffers on the immobilization of lipase. (b) Effect of pH on the immobilization of lipase. (c) Effect of temperature on the immobilization of lipase. (d) Effect of the quantity of kieselguhr on the immobilization of lipase. (e) Effect of NH_4Cl additive concentration on the immobilization of lipase. (f) Effect of immobilizing time on the immobilization of lipase.

2.3.6 NH_4Cl 添加剂正交实验

设置 5 因素 4 水平的正交表，结果如表 4 所示，通过计算各因素所对应的水平相对酶活力之和 K 值判断出最佳水平，结果为最佳固定化 pH 是 6.0，最佳固定化温度 30℃，载体投

放量 0.5g，NH_4Cl 添加剂最佳浓度为 25mmol/L，固定化时间 3.0h。通过计算各因素对应 K 值得出极差 R，由 R 可知影响因素为：载体量>温度>时间>pH>浓度。在最佳正交条件下，固定化酶活力达 115.27U/g，而在不含 NH_4Cl 添加剂的空白组中固定化酶活力为 78.19U/g。

表 4.使用 NH_4Cl 的吸附固定化条件优化正交实验结果与分析

Table 4. Optimization of orthogonal experimental results and analysis of immobilization conditions through adsorption in the presence of NH_4Cl

序号 Number	pH pH	温度/℃ Temperature/℃	载体量/g Quantity of carrier/g	浓度/mmol/L Concetration /mmol/L	时间/h Time/h	相对酶活力/% Relative enzyme activity/%
1	5.0	20	0.5	10	1.5	72.62±0.97
2	5.0	25	1.0	15	3.0	76.87±0.86
3	5.0	30	1.5	20	4.5	66.82±0.73
4	5.0	35	2.0	25	6.0	55.87±0.96
5	5.5	20	1.0	20	6.0	62.74±1.40
6	5.5	25	0.5	25	4.5	91.14±0.51
7	5.5	30	2.0	10	3.0	61.77±1.03
8	5.5	35	1.5	15	1.5	44.82±1.41
9	6.0	20	1.5	25	3.0	61.55±1.34
10	6.0	25	2.0	20	1.5	55.21±0.43
11	6.0	30	0.5	15	6.0	100.00±1.28
12	6.0	35	1.0	10	4.5	66.62±0.61
13	6.5	20	2.0	15	4.5	55.36±0.63
14	6.5	25	1.5	10	6.0	65.41±1.11
15	6.5	30	1.0	25	1.5	71.53±0.43
16	6.5	35	0.5	20	3.0	91.06±1.36
K1	272.17	252.27	354.82	266.41	244.18	
K2	260.48	288.63	277.75	277.05	291.25	
K3	283.38	300.12	238.60	275.83	279.94	
K4	283.36	258.37	228.22	280.10	284.02	
R	22.90	47.85	126.60	13.68	47.07	
优势水平	3	3	1	4	2	
优势组合	pH6.0，温度 30℃，载体量 0.5g，浓度 25mmol/L，时间 3.0h					
主次因素	载体量>温度>时间>pH>浓度					

2.4 甘露糖添加剂固定化条件对脂肪酶吸附固定化的影响

2.4.1 缓冲液类型及 pH 对脂肪酶固定化的影响

在 pH 为 6.5 的条件下，本实验使用了 4 种类型的缓冲液，分别为磷酸钠缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液、磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液。结果如图 3(a)所示，磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液固定化效果最好。因此选择磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液作为后续优化缓冲液。

使用选出的磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液进行 pH 值对脂肪酶吸附固定化的影响。设置了 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的 pH 梯度。由图 3(b)可知，缓冲液在 pH6.5 时酶活力达到最高，之后呈下降趋势，因此最佳固定化 pH 为 6.5。

2.4.2 温度对吸附固定化的影响

由图 3(c)可知，随着固定化温度升高，固定化脂肪酶的活力上升，在 30℃时达到最高值，之后总体呈现下降趋势。这是因为温度影响分子热运动的速率，在一定的固定化时间内，温度越高，酶分子附着到载体上的速率越大；同时，温度过高致使酶蛋白分子的天然结构和活性中心发生改变，从而导致酶活性下降[22][23]。因此最适固定化温度为 30℃。

2.4.3 载体量对吸附固定化的影响

在保持酶浓度不变的前提下改变吸附载体量的质量，当载体质量少时吸附效率低，当载体质量多时浪费吸附载体，因此在特定的酶浓度下需要摸索最适吸附载体量。在 10.0mL 浓度为 2.0mg/mL 的脂肪酶上清液中加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5g 的大孔吸附树脂 DA-201 载体，其他条件同 2.4.2。结果如图 3(d)所示，随着载体投放量逐渐增加，酶活力逐渐下降。原因可能是在载体投放量较少时，单位载体所吸附的酶分子较多，当载体量逐渐增多时，单位载体所吸附的酶分子逐步变少，所以酶活力下降。

2.4.4 甘露糖浓度对吸附固定化的影响

将甘露糖配成 500mmol/L 的母液，然后在 10mL 的酶上清液中稀释成 2、5、10、20、30mmol/L 的浓度梯度，其他条件同 2.4.3。结果如图 3(e)所示，因此 10mmol/L 为脂肪酶吸附固定化的最佳甘露糖浓度。

2.4.5 固定化时间对吸附固定化的影响

设置了 1.5、3.0、6.0、9.0、12.0h 的时间梯度，结果如图 3(f)所示，随着固定化时间的增长，酶活力总体呈下降趋势。原因可能是随着固定化时间的延长，DA-201 载体的孔隙吸附的酶分子逐渐增多，造成孔隙吸附的酶分子饱和、导致阻塞，酶促反应时酶分子不能充分展开，酶活力随之降低[23]。

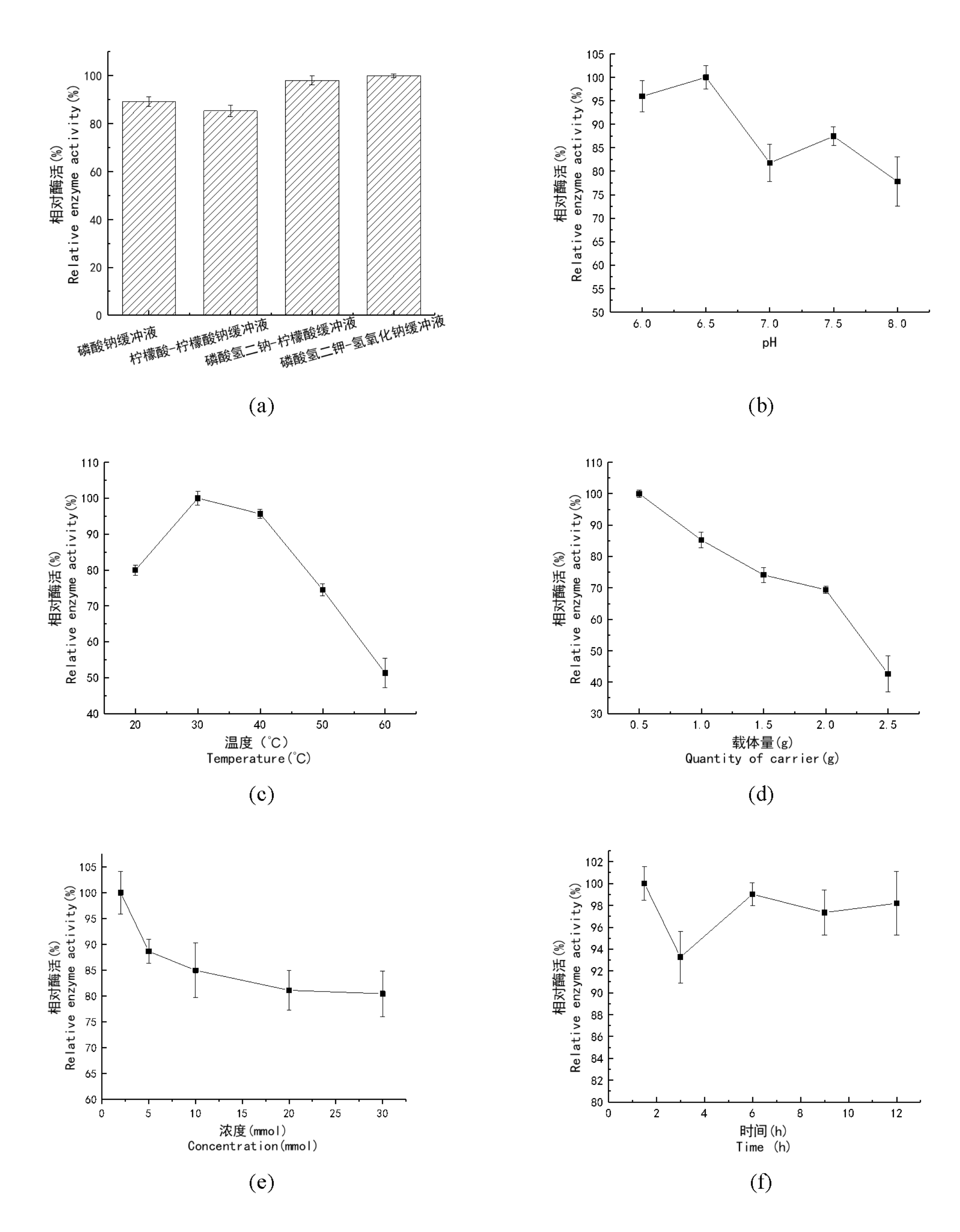


图 3. 甘露糖添加剂各条件对脂肪酶吸附固定化的影响

Fig.3 Optimization of lipase immobilization in the presence of mannose

(a) Effect of buffers on the immobilization of lipase. (b) Effect of pH on the immobilization of lipase. (c) Effect of temperature on the immobilization of lipase. (d) Effect of the quantity of kieselguhr on the immobilization of lipase. (e) Effect of mannose additive concentration on the immobilization of lipase. (f) Effect of immobilizing time on the immobilization of lipase.

2.4.6 甘露糖添加剂正交实验

设置 5 因素 4 水平的正交表，通过计算各因素所对应的水平相对酶活力之和 K 值判断出最佳水平，结果为最佳固定化 pH7.0，最佳固定化温度 35℃，载体投放量 0.5g，甘露糖添加剂最佳浓度为 10mmol/L，固定化时间 4.5h。通过计算各因素对应 K 值得出极差 R，由 R 可知，影响因素为：载体量>时间>pH>浓度>温度。在最佳正交条件下，固定化酶活力达

122.75U/g，而在不含甘露糖添加剂的空白组中固定化酶活力为 115.26U/g。

表 5.使用甘露糖的吸附固定化条件优化正交实验结果与分析

Table5. Optimization of orthogonal experimental results and analysis of immobilization conditions through adsorption in the presence of mannose

序号 Number	pH	温度/℃ Temperature/℃	载体量/g Quantity of carrier/g	浓度/mmol/L Concetration/ mmol/L	时间/h Time/h	相对酶活力/% Relative enzyme activity/%
1	6.0	25	0.5	2	1.5	80.57±1.23
2	6.0	30	1.0	5	3.0	55.17±2.50
3	6.0	35	1.5	10	4.5	71.18±1.97
4	6.0	40	2.0	15	6.0	50.25±2.13
5	6.5	25	1.0	10	6.0	82.37±1.91
6	6.5	30	0.5	15	4.5	93.74±0.49
7	6.5	35	2.0	2	3.0	44.10±1.86
8	6.5	40	1.5	5	1.5	54.56±1.79
9	7.0	25	1.5	15	3.0	61.60±1.50
10	7.0	30	2.0	10	1.5	47.96±0.50
11	7.0	35	0.5	5	6.0	100.00±0.81
12	7.0	40	1.0	2	4.5	70.73±2.32
13	7.5	25	2.0	5	4.5	46.93±1.38
14	7.5	30	1.5	2	6.0	48.55±0.79
15	7.5	35	1.0	15	1.5	65.13±0.87
16	7.5	40	0.5	10	3.0	79.81±0.50
K1	257.18	271.47	354.12	243.95	248.23	
K2	274.77	245.42	273.40	256.66	240.69	
K3	280.29	280.42	235.90	281.32	282.58	
K4	240.42	255.34	189.24	270.73	281.16	
R	39.87	35.00	164.89	37.37	41.89	
优势水平	3	3	1	3	3	
优势组合	pH7.0，温度 35℃，载体量 0.5g，浓度 10mmol/L，时间 4.5h					
主次因素	载体量>时间>pH>浓度>温度					

2.5 甘氨酸添加剂固定化条件对脂肪酶吸附固定化的影响

2.5.1 缓冲液类型及 pH 对脂肪酶固定化的影响

在 pH 为 6.5 的条件下，本实验使用了 4 种类型的缓冲液，分别为磷酸钠缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液、磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液。结果如图 4(a)所示，磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液固定化效果最好。因此选择磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液作为后续优化缓冲液。使用甘氨酸添加剂时，其最适缓冲液与以甘露糖为缓冲液的缓冲液相同而与以 NH_4Cl 为添加剂的缓冲液不同，这可能是因为氨基酸和甘露糖能改变大孔吸附树脂和缓冲液的电荷性以及脂肪酶的电离状态，同时也有可能对脂肪酶的催化性能有一定的影响。

使用选出的磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液进行 pH 值对脂肪酶吸附固定化的影响。设置了 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的 pH 梯度。由图 4(b)可知，缓冲液在 pH7.0 时酶活力达到最高，

之后呈下降趋势，因此最佳固定化 pH 为 7.0。

2.5.2 温度对吸附固定化的影响

由图 4(c)可知，随着固定化温度升高，固定化脂肪酶的活力上升，在 30℃时达到最高值，之后总体呈现下降趋势，因此最适固定化温度为 30℃。

2.5.3 载体量对吸附固定化的影响

在 10.0mL 浓度为 2.0mg/mL 的脂肪酶上清液中加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5g 的大孔吸附树脂 DA-201 载体，其他条件同 2.5.2。结果如图 4(d)所示，随着载体投放量逐渐增加，酶活力逐渐下降，因此最适载体量为 0.5g。

2.5.4 甘氨酸浓度对吸附固定化的影响

将甘氨酸成 500mmol/L 的母液，然后在 10mL 的酶上清液中稀释成 2、5、10、20、30mmol/L 的浓度梯度，其他条件同 2.5.3。结果如图 4(e)所示，因此 25mmol/L 为脂肪酶吸附固定化的最佳甘氨酸浓度。

2.5.5 固定化时间对吸附固定化的影响

设置了 1.5、3.0、6.0、9.0、12.0h 的时间梯度，结果如图 4(f)所示，随着固定化时间的增长，酶活力先逐渐上升，在 6.0h 时达到最高，之后总体呈下降趋势。原因可能是随着固定化时间的延长，DA-201 载体的孔隙吸附的酶分子逐渐增多，酶活力也随之增高；而当 DA-201 载体过长时间浸泡在酶溶液中，孔隙吸附的酶分子饱和导致阻塞，酶促反应时酶分子不能充分展开，酶活力随之降低。因此最适固定化时间是 6.0h。

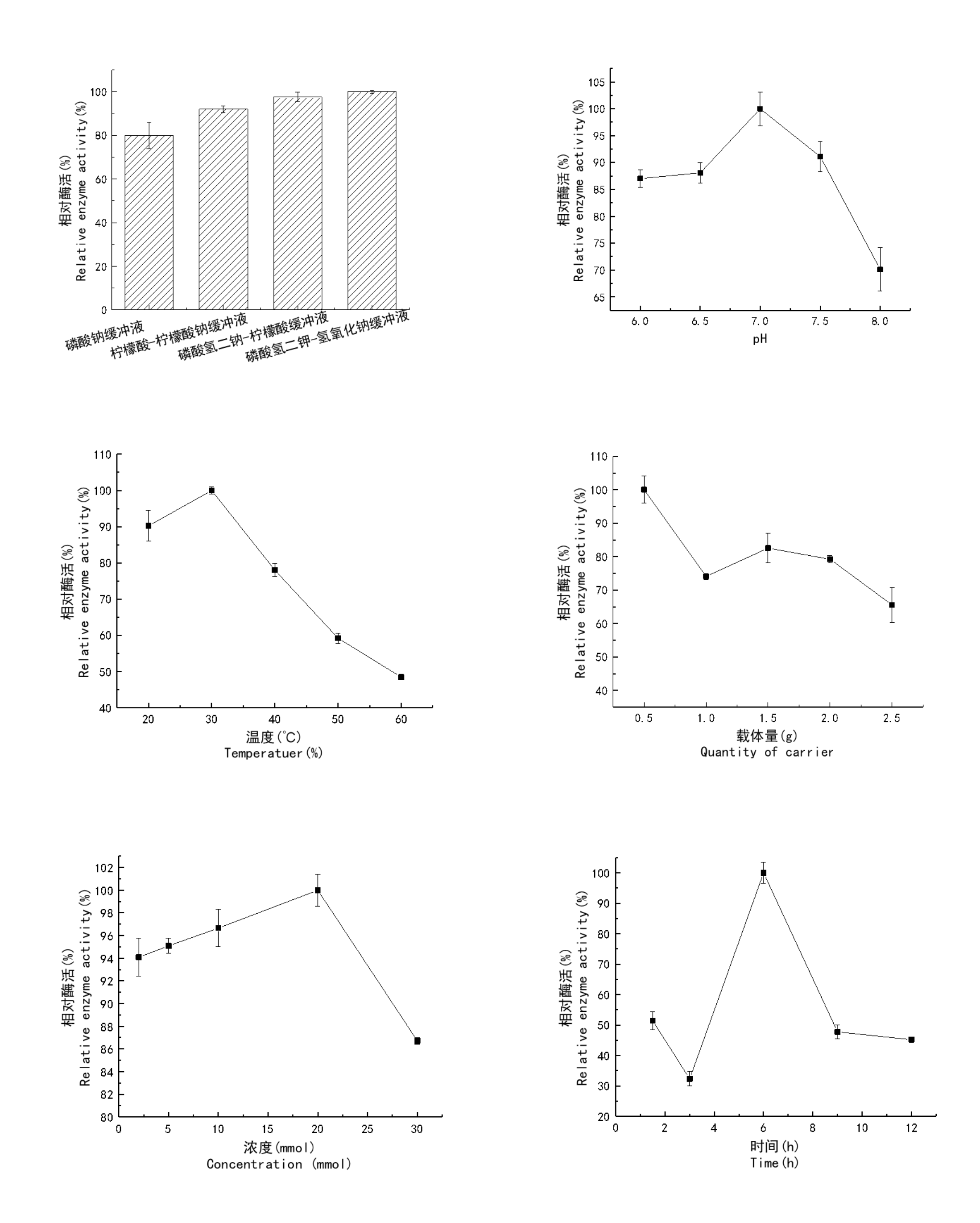


图 4 甘氨酸添加剂各条件对脂肪酶吸附固定化的影响

Fig.4 Optimization of lipase immobilization in the presence of glycine

(a) Effect of buffers on the immobilization of lipase. (b) Effect of pH on the immobilization of lipase. (c) Effect of temperature on the immobilization of lipase. (d) effect of the quantity of kieselguhr on the immobilization of lipase. (e) Effect of glycine additive concentration on the immobilization of lipase. (f) Effect of immobilizing time on the immobilization of lipase.

2.5.6 甘氨酸正交实验

设置 5 因素 4 水平的正交表，通过计算各因素所对应的水平相对酶活力之和 K 值判断出最佳水平，结果为最佳固定化 pH7.0，最佳固定化温度 20℃，载体投放量 0.5g，甘氨酸添加剂最佳浓度为 25mmol/L，固定化时间 7.5h。通过计算各因素对应 K 值得出极差 R，由 R

可知，影响因素：载体量>pH>温度>时间>浓度。在最佳固定化条件下，固定化酶活力达到 141.69U/g，而在不含甘氨酸添加剂的空白组中固定化酶活力为 112.34U/g。

表 6：使用甘氨酸吸附固定化条件优化正交实验结果与分析

Table6. Optimization of orthogonal experimental results and analysis of immobilization conditions through adsorption in the presence of glycine

序号 Number	pH	温度/℃ Temperature/℃	载体量/g Quantity of carrier/g	浓度/mmol/L Concetration/ mmol/L	时间/h Time/h	相对酶活力/% Relative enzyme activity/%
1	6.0	20	0.5	10	3.0	89.55±0.52
2	6.0	25	1.0	15	4.5	70.73±1.11
3	6.0	30	1.5	20	6.0	52.93±0.52
4	6.0	35	2.0	25	7.5	50.92±0.51
5	6.5	20	1.0	20	7.5	78.02±2.12
6	6.5	25	0.5	25	6.0	86.82±1.59
7	6.5	30	2.0	10	4.5	48.21±0.54
8	6.5	35	1.5	15	3.0	50.09±0.82
9	7.0	20	1.5	25	4.5	75.86±1.08
10	7.0	25	2.0	20	3.0	66.10±1.57
11	7.0	30	0.5	15	7.5	100.00±1.42
12	7.0	35	1.0	10	6.0	72.46±0.57
13	7.5	20	2.0	15	6.0	59.18±1.06
14	7.5	25	1.5	10	7.5	61.70±0.77
15	7.5	30	1.0	25	3.0	76.22±0.89
16	7.5	35	0.5	20	4.5	81.37±0.88
K1	264.13	302.61	357.74	271.92	281.97	
K2	263.15	285.36	297.43	280	276.17	
K3	314.42	277.36	240.58	278.41	271.39	
K4	278.47	254.84	224.42	289.83	290.64	
R	51.27	47.76	133.33	17.91	19.25	
优势水平	3	1	1	4	4	
优势组合	pH7.0 温度 20℃载体量 0.5 浓度 25 时间 7.5h					
主次因素	载体量>pH>温度>时间>浓度					

3.讨论

使用吸附树脂吸附是一种重要的固定化酶方法。本研究从 9 种大孔吸附树脂种筛选出对脂肪酶吸附效果最好的 DA-201 载体，然后利用该载体进行后续的吸附固定化酶实验。探究了 NH_4Cl、甘露糖和甘氨酸等 3 种添加剂对该大孔吸附树脂吸附固定化酶的影响。通过单因素和正交实验，确定了加入不同的添加剂对脂肪酶吸附固定化的优化条件。以 NH_4Cl 为添加剂的吸附固定化工艺条件是：柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 pH 是 6.0、最佳固定化温度 30℃、载体投放量 0.5g、NH_4Cl 添加剂最佳浓度为 25mmol/L、固定化时间 3.0h，在此工艺条件下酶活力达到 115.27U/g，酶活力回收率达 11.06%，含有添加剂的固定化酶比不含有添加剂的固定化酶固定化效率高 47.42%；以甘露糖为添加剂的吸附固定化工艺条件：磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液 pH 是 7.0、最佳固定化温度 35℃、载体投放量 0.5g、甘露糖添加剂最佳浓度

为 10mmol/L、固定化时间 4.5h，在此工艺条件下酶活力达到 122.75U/g，酶活力回收率达 12.24%，含有添加剂的固定化酶比不含有添加剂的固定化酶固定化效率高 6.50%；以甘氨酸为添加剂的吸附固定化工艺条件是：磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液 pH 是 7.0、最佳固定化温度 20 ℃、载体投放量 0.5g、甘氨酸添加剂最佳浓度为 25mmol/L、固定化时间 7.5h，在此工艺条件下酶活力达到 141.69U/g，酶活力回收率达 10.11%，含有添加剂的固定化酶比不含有添加剂的固定化酶固定化效率高 26.12%。本研究表明，无机盐 NH_4Cl 和氨基酸甘氨酸添加剂，在经系统的过程优化后，可以较好的提高大孔吸附树脂固定化脂肪酶的效率。

本研究在筛选载体过程中，选出了吸附效果最好的大孔吸附树脂 DA-201。DA-201 吸附树脂载体是一种苯乙烯型极性共聚体，有很强的吸附能力，尤其是对极性物质的吸附性能更加明显。同时，大孔吸附树脂 DA-201 的吸附固定化属于物理吸附过程，相较于化学固定化法，大孔吸附树脂 DA-201 的吸附不易破坏酶活性中心和酶的高级结构，从而对酶的催化活性乃至光学选择性的影响较小。

使用 NH_4Cl、甘露糖和甘氨酸三种添加剂进行大孔吸附树脂 DA-201 吸附固定化脂肪酶，所使用的缓冲液对吸附固定化具有很大的影响，其中在使用 NH_4Cl 添加剂时，最佳缓冲液为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液；而使用甘露糖和甘氨酸添加剂时，最佳缓冲液则为磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液。同时，溶液的 pH 对吸附固定化有很大的影响，其中在使用 NH_4Cl 添加剂时，最佳 pH 为 6.0，而使用甘露糖和甘氨酸添加剂时，最佳 pH 都为 7.0。固定化温度对吸附固定化有较大的影响，在使用 NH_4Cl、甘露糖和甘氨酸添加剂时，最佳固定化温度分别为 30℃、35℃和 20℃。而添加剂浓度对吸附固定化也有一定程度影响，使用甘露糖时，最适浓度为 10 mmol/L，而使用 NH_4Cl 和甘氨酸的最适浓度相同，都为 25mmol/L。固定化时间对吸附固定化也有很大的影响，其中在使用 NH_4Cl 添加剂时，最佳固定化时间为 3.0h；而使用甘露糖和甘氨酸添加剂时，最佳固定化时间分别为 4.5h 和 7.5h。本研究中所考量的载体量投放量对大孔吸附树脂 DA-201 吸附固定化脂肪酶的影响差异相对较小。因此，在所使用的 NH_4Cl、甘露糖和甘氨酸三种添加剂时，缓冲液类型、缓冲液 pH、固定化温度、添加剂浓度和固定化时间对大孔吸附树脂 DA-201 吸附固定化脂肪酶具有较大的影响。有可能所加入的不同类型的添加剂，因为添加剂的分子结构和电荷等的差异，当采用不同固定化条件时，对大孔吸附树脂 DA-201 吸附固定化脂肪酶的效果产生极大的影响。在有机吸附树脂载体吸附固定化酶的过程中，添加适当的添加剂并对吸附过程进行相应的优化，可以很好的促进有机吸附载体吸附固定化酶。

参考文献

[1]念保义,黄志华,罗菊香,等.脂肪酶转酯化和水解反应拆分薄荷醇的研究进展.化工进展,2011,30(06):1320-1325.

Niang B Y, Huang Z H, Luo J X, et al. Advances in lipase transesterification and hydrolysis reaction for resolution of menthol. Chemical progress,2011,30(06):1320-1325.

[2]蒋振华,于敏,任立伟,等.有机相中固定化脂肪酶催化合成植物甾醇酯.催化学报,2013,34(12):2255-2262.

Jiang Z H, Yu M, Ren L W, et al. Catalytic synthesis of phytosterol esters by immobilized lipase in organic phase. Chinese Journal of Catalysis,2013,34(12):2255-2262.

[3]赵天涛,高静,张丽杰,等.有机相中脂肪酶催化合成乳酸乙酯.催化学报,2006(06):537-540.

Zhao T T, Gao J, Zhang L J, et al. Catalytic Synthesis of Ethyl Lactate by Lipase in Organic Phase. Chinese Journal of Catalysis, 2006(06): 537-540.

[4]相欣然,黄和,胡燚.纳米复合材料固定化酶的研究进展.无机化学学报,2017,33(01):1-15.

Xiang X R, Huang H, Hu Y. Advances in Research on Immobilized Enzymes of Nanocomposites.

Journal of Inorganic Chemistry, 2017, 33(01): 1-15.
[5]Tran D N, Balkus K J. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. ACS Catalysis,2011,1(8):956-968.
[6]Rodrigues R C, Oritiz C, Berenguer-Murcia A, et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. Chemical Society Reviews.,2013,42(15):6290-6307.
[7]Zhang Y, Ge J, Liu Z. Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes. ACS Catalysis,2015,5(8):4503-4513.
[8]韩志萍,叶剑芝,罗荣琼.固定化酶的方法及其在食品中的应用研究进展.保鲜与加工,2012,12(05):48-53.
Han Z P, Ye J Z, Luo R Q. Advances in immobilized enzymes and their applications in foods. Preservation and processing, 2012, 12(05): 48-53.
[9]徐珊,李任强,张继福,等.乙二醇缩水甘油醚交联海藻酸钠-羧甲基纤维素钠固定化脂肪酶.中国生物工程杂志,2017,37(12):77-83.
Xu S, Li R Q, Zhang J F, et al. Ethylene glycol diglycidyl ether cross-linked with sodium alginate-carboxymethyl cellulose to immobilized lipase. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 37 (12): 77-83.
[10]游金坤,余旭亚,赵鹏.吸附法固定化酶的研究进展.化学工程，2012，40（4）：1-5.
You J K, Yu X Y, Zhao P. Advances in Adsorption of Immobilized Enzymes. Chemical Engineering, 2012, 40(4): 1-5.
[11]王跃生,王洋.大孔吸附树脂研究进展.中国中药杂志,2006(12):961-965.
Wang Y S, Wang Y. Research progress of macroporous adsorption resin. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2006 (12): 961-965.
[12]黄永林,阮俊,沈晓琳,等.大孔吸附树脂分离提取大叶钩藤总生物碱.广西科学,2006(02):127-129.
Huang Y L, Ruan J, Shen X L, et al. Separation and extraction of total alkaloids from Uncaria macrophylla by macroporous adsorption resin. Guangxi Science, 2006 (02): 127-129.
[13]吕洁丽,杨中汉,袁珂.新型凝胶树脂及大孔吸附树脂在中草药成分分离纯化中的应用.中药材,2005(03):239-242.
Lv J L, Yang Z H, Yuan K. Application of New Gel Resin and Macroporous Resin in Separation and Purification of Chinese Herbal Medicine Components. Chinese Medicinal Materials, 2005(03): 239-242.
[14]谢雪凤,张朝晖,陈培策.AB-8 大孔吸附树脂固定化过氧化氢酶的研究.材料导报,2009,23(18):50-53.
Xie X F, Zhang Z H, Chen P. Research on immobilization of catalase by AB-8 macroporous adsorption resin. Materials Review, 2009, 23(18): 50-53.
[15]赵庆节,余莹,周文瑜,等.有机相中大孔吸附树脂固定化酶催化拆分消旋萘普生.华东理工大学学报,2001(04):423-426.
Zhao Q J, Yu Y, Zhou W Y, et al. Catalytic resolution of racemic naproxen by macroporous adsorption resin immobilized enzyme in organic phase. Journal of East China University of Science and Technology, 2001(04): 423-426.
[16]王海雄,吴侯,翁新楚.大孔吸附树脂固定猪胰脂酶的初步研究.生物技术,2004(03):27-30.
Wang H X, Wu H, Weng X C. Preliminary study on fixation of porcine pancreatic lipase by macroporous adsorption resin. Biotechnology, 2004 (03): 27-30.
[17]Chang C S, Hsu C S. Enhancement of enantioselectivity on reaction rate of the synthesis

of(S)-ketoprofen hydroxyalkyl ester in organic solvents via isopropanol-dried immobilized lipase. Jonrnal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005,80(5):537-544.
[18]彭维,欧爱芬.金属离子对酶活性影响研究.酿酒,2013,40(01):60-62.
Peng W, Ou A F. Research on the effect of metal ions on enzyme activity. Winemaking, 2013, 40 (01): 60-62.
[19]侯爱军，徐冰斌，梁亮,等.改进铜皂-分光光度法测定脂肪酶活力.皮革科学与工程，2011，21（1）：22-27.
Hou A J, Xu B B, Liang L, et al. Improved copper soap-spectrophotometry for determination of lipase activity. Leather Science and Engineering, 2011, 21(1): 22-27.
[20]袁勤生.酶与酶工程.第二版.上海:华东理工大学出版社,2012:38-39.
Yuan Q S. Enzyme and Enzyme Engineering. 2nd ed. Shanghai: East China University of Science and Technology Press, 2012: 38-39.
[21]GB/T 23535-2009. 脂肪酶制剂.
GB/T 23535-2009. Lipase preparation.
[22]侯丽云.脂肪酶固定化及其在催化合成乙酸香茅酯中的应用研究.扬州大学,2013.
Hou L Y. Lipase immobilization and its application in catalytic synthesis of citronellyl acetate. Yangzhou University, 2013.
[23]徐珊,李任强,张继福,等.使用国产环氧树脂LXEP-120固定化脂肪酶研究.广西师范大学学报(自然科学版),2018,36(04):108-118.
Xu S, Li R Q, Zhang J F, et al. Immobilization of lipase using domestic epoxy resin LXEP-120. Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition), 2018, 36(04): 108-118.